

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001078718  
PUBLICATION DATE : 27-03-01

APPLICATION DATE : 27-08-99  
APPLICATION NUMBER : 11241850

APPLICANT : BASF AG;

INVENTOR : FRIEDRICH THOMAS DR;

INT.CL. : A23L 1/305 A23J 3/00 A23K 1/14 A23K 1/16 A23K 1/165 A23L 3/3463

TITLE : PRODUCTION OF ACTIVE INGREDIENT PREPARATION, ACTIVE INGREDIENT PREPARATION AND FOOD OR FEED

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To avoid the use of an aldehyde as a cross-linking agent and obtain an active ingredient preparation excellent in safety and useful for a food, a feed, etc. by carrying out an atomization of a cross-linkable protein, a transglutaminase and the active ingredient under specific conditions.

SOLUTION: (A) A cross-linkable protein selected from the group of gelatin, casein, soybean proteins, corn proteins and collagen is completely mixed with a transglutaminase derived from a microorganism and an aqueous solution of an active ingredient such as a vitamin, a human food additive or an animal feed additive and the ratio of the active ingredient to the protein is (1:10) to (4:1) expressed in terms of weight. Furthermore, an atomization of the resultant mixture is then carried out in an inert gas atmosphere loaded with a hydrophobic silica, corn starch or a hydrophobic corn starch to produce an active ingredient preparation. The resultant preparation is preferably further dried until the residual moisture content is below 10 wt.% subsequently to the atomization.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-78718

(P2001-78718A)

(43) 公開日 平成13年3月27日 (2001.3.27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ノート* (参考)
A 2 3 L 1/305		A 2 3 L 1/305	2 B 1 5 0
A 2 3 J 3/00		A 2 3 J 3/00	4 B 0 1 8
A 2 3 K 1/14		A 2 3 K 1/14	4 B 0 2 1
	1/16 3 0 1	1/16	3 0 1 B
	3 0 2		3 0 2 B
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-241850

(22) 出願日 平成11年8月27日 (1999.8.27)

(71) 出願人 590001212

ビーユーエスエフ アクチエンゲゼルシャ  
フト

ドイツ連邦共和国 ルートヴィッヒスハー  
フェン カールーボッシュェストラッセ  
38

(72) 発明者 ヴォルフガング ベヴェルト

ドイツ連邦共和国 フランケンタール ロ  
ルシャー リング 8 ツェー

(74) 代理人 100061815

弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性成分調製剤の製造方法、活性成分調製剤及び食品又は飼料

(57) 【要約】

【課題】 活性成分の熱による分解並びに架橋剤とし  
てのアルデヒドの使用を回避する活性成分調製剤の製造  
方法

【解決手段】 a) 架橋可能なタンパク質、トランス  
グルタミナーゼ及び活性成分の水溶液を完全に混合する  
工程、b) アトマイゼーションする工程からなり、そ  
の際、活性成分とタンパク質との割合が重量で1対10  
～4対1である、活性成分調製剤の製造方法

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 活性成分調製剤の製造方法において、

a) 架橋可能なタンパク質、トランスグルタミナーゼ及び活性成分の水溶液を完全に混合する工程

b) アトマイゼーションする工程

からなり、その際、活性成分とタンパク質との割合が重量で1対10～4対1である、活性成分調製剤の製造方法。

【請求項2】 活性成分が、ビタミン、ヒトの食品添加物又は動物の飼料添加物である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 活性成分が疎水性である、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 架橋可能なタンパク質がゼラチン、カゼイン、ダイズタンパク質、トウモロコシタンパク質及びコラーゲンのグループから選択される、請求項1から3までのいずれか1項記載の方法。

【請求項5】 微生物から得られたトランスグルタミナーゼを使用する、請求項1から4までのいずれか1項記載の方法。

【請求項6】 疎水性シリカ、コーンスターチ又は疎水性コーンスターチで負荷された不活性ガス雰囲気中へアトマイゼーションを行う、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

【請求項7】 アトマイゼーションに引き続き、残留水分含有率が10重量%を下回るまで乾燥を行う、請求項1から6までのいずれか1項記載の方法。

【請求項8】 活性成分調製剤の温度を主に80℃以下に保持する、請求項1から7までのいずれか1項記載の方法。

【請求項9】 請求項1から8までのいずれか1項記載の方法により得られた活性成分調製剤。

【請求項10】 活性成分が次のグループ：

カロテノイド

ビタミンA

ビタミンE

ビタミンD。

から選択される、請求項9記載の活性成分調製剤。

【請求項11】 活性成分の重量の0.025倍～4倍の離型剤又は離型剤混合物の含有量を有する、請求項9又は10記載の活性成分調製剤。

【請求項12】 請求項9から11までのいずれか1項記載の活性成分調製剤を有するヒトの食品又は動物飼料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、1種以上の活性成分がタンパク質マトリックス中に埋め込まれ、その際、前記タンパク質はトランスグルタミナーゼで架橋されている、活性成分調製剤に関する。この活性成分調製剤は、例えば安定な乾燥した粉末の形である。さらに、本

発明は前記の調製剤を有するヒトの食品又は動物飼料、乾燥粉末の製造方法及び架橋したタンパク質の特別な使用に関する。本発明は、特に、ビタミン、ヒトの食品添加物及び動物の飼料添加物、例えばカロテノイドを有する乾燥粉末に関する。さらに多様な添加物について埋め込むこともできる。

## 【0002】

【従来の技術】粉末の形のビタミン及びカロテノイド製品は、一般に公知であり、調剤工業において及びヒトの食品及び動物飼料工業において大規模に使用されている。このように、適当な製品の製造のための多様な製造方法が文献に記載されている。

【0003】多様な製造方法、特にスプレー法は、酸化しやすい物質、例えば油性ビタミン又はカロテノイドを酸化作用に対して保護することができる粉末の形の調製剤の製造について記載している。

【0004】ドイツ国特許第1035319号明細書は、低水分含有量(8%以下)を有する粉末化されたスターチの大過剰量中への油性ビタミンの分散液のアトマイジングを記載している。水はアトマイジングされた粒子から乾燥したスターチ粉末により除去される。この粉末は固化され、この場合、粒子の表面の大量のスターチは接着性のままである。さらに過剰のスターチ含有量を除去し、引き続きこれらをプロセスへ戻す必要がある。

【0005】スイス国特許第488455号明細書は、撓水性の無機物質及び吸水性物質の混合物をダスティング剤として使用することが記載されている。それにより微細に分散した乾燥スターチにより生じる爆発の危険性は回避される。

【0006】スイス国特許第389505号明細書は、冷却した気体媒体中で活性成分の分散液をアトマイジングさせ、媒体中でアトマイジングした粒子を冷却により固化させることを記載している。この方法のために15mまでの落下の高さが必要であり、さらに、温度は室温よりも明らかに低く保たなければならない。

【0007】アトマイジングした粒子の固化のための他の可能な方法は、高級脂肪酸の金属塩からなる粉末中でのトラッピングである。この方法はスイス国特許第431252号明細書に記載されている。

【0008】安定な活性成分含有調製剤を製造するためのもう一つの方法は、欧州特許第0618001号明細書に記載されている。この場合、活性成分が多様な担持物質の混合物中に埋め込まれている球状粒子は、まず活性成分、油の形の物質、タンパク質及び水を水と混合できない溶剤に添加することよりなる第1の水中油型エマルジョンから球状体を制御して分配することにより形成され、次いで得られた球状物を分離することにより製造される。特別な混合系がこの球状体の製造のために必要である。この場合に得られた粒子は、次にアルデヒド、例えばアセトアルデヒド、グルタルアルデヒド又はグリオ

キサールで処理され、その際、化学的架橋（この架橋は得られた材料が水中で不溶性であることから明らかである）が生じ、次いで付加的に活性成分の安定化が達成される。

【0009】米国特許第4670247号明細書には、架橋した粒子の他の製造方法が記載されている。これは、最初に、主に油性ビタミン、保護コロイド、例えばゼラチン及び還元糖からなるエマルジョンをスプレープロセス及び乾燥プロセスにより粉末の形の粒子に変換することにより行われる。この粒子は次いで熱的プロセスにおいて105～180℃の温度に加熱される。タンパク質のアミノ基と還元糖のオキシ基とのメイラード反応により、マトリックス成分の架橋により生じる乾燥粉末の非水溶性化が達成される。

【0010】欧州特許第782883号明細書は、カプセル壁を有する食用マイクロカプセルを記載しており、これはタンパク質を食用塩で塩析し、カプセル壁をトランスグルタミナーゼで架橋させることにより製造される。

【0011】酸化しやすい化合物、この場合特に脂溶性ビタミン及びカロテノイドが空気と接触する場合、酸素との反応が起こり、不所望な化合物へ変換されるため、活性成分の損失につながる。この酸化を避けるために、例えば、タンパク質中の反応性の基と反応させることにより酸素に対して僅かな透過性にし、こうして活性成分に安定化保護を付与する特定の添加剤を調製剤に添加することもできる。これは、水中で可溶性のタンパク質を防止するために、例えばマイラードタイプの反応において還元糖とタンパク質とを反応させることにより実施することができる。これは、同様に担持マトリックスに関して安定性を増大させるアルデヒドとタンパク質とを反応させることにより架橋を達成することもできる。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、この方法は、改善された安定化方法を探すのが望ましいことが明らかであるような一定の欠点を有する。このように、タンパク質と還元糖との間のマイラード反応の使用はいかなる場合でも熱的なストレスを意味し、従って、少なくとも若干の活性成分の分解を意味する。さらに、この生成物は褐色がかかった色調になる傾向がある。

【0013】架橋剤としてのアルデヒドの使用は、この場合、健康に極端に害となる高い反応性添加物を使用するという多様な欠点と関連している。この方法により製造された生成物は消費者に無条件に受け入れるものではない。

【0014】

【課題を解決するための手段】それに対して、安定化の原則として酵素による架橋を使用することは熱的プロセスの回避及び全ての食物連鎖の天然成分である物質のあらゆる点で害のない添加の両方を意味する。この精製物

はさらに褐色がかかった色調を有していない。

【0015】活性成分調製剤を製造する本発明による方法は、

a) 架橋性タンパク質、トランスグルタミナーゼ及び活性成分の水溶液を完全に混合する工程、

b) アトマイゼーションする工程

よりなり、その際、活性成分とタンパク質との割合は重量で1対10～4対1にある。

【0016】活性成分とタンパク質との有利な割合は重量で1対4～2対1、特に有利に1対3～1対1である。

【0017】有利な架橋性タンパク質はゼラチン、カゼイン、グイズタンパク質、トウモロコシタンパク質及びコラーゲンである。

【0018】本発明による有利な方法は、活性成分含有エマルジョン又は分散液を疎水性シリカで負荷された不活性ガス雰囲気中へアトマイゼーションする方法である。

【0019】さらに有利な方法は、アトマイゼーションに引き続き、10重量%を下回る、有利に6重量%を下回る残留水分含有率にまで乾燥する方法である。

【0020】本発明による方法の温度は、主に80℃以下、有利に60℃以下に保持される。

【0021】さらに本発明は本発明による方法により得られた活性成分調製剤に関し、及び更なる態様として、活性成分の重量の0.025倍～4倍の離型剤又は離型剤混合物を含有する活性成分調製剤、及び前記タイプの活性成分調製剤を有するヒトの食品又は動物の飼料に関する。

【0022】有利な離型剤は、疎水性シリカ、コーンスターチ、化学的処理により疎水性にされたコーンスターチ、高級脂肪酸の金属塩及び他の植物性スターチである。

【0023】疎水性シリカの場合、活性成分に対する含有率は0.025～0.4、有利に0.05～0.2の範囲内にある。コーンスターチの場合、相応する割合は有利に0.25～2、特に有利に0.5～1.5である。

【0024】本発明による活性成分調製剤は、主に活性成分、タンパク質及び例えば炭水化物及び／又は天然又は化学的に変性されたスターチのグループからの他の担持剤及び充填剤からなる分散液を製造することにより得られる。これはさらに他の添加剤、例えば安定剤又は乳化剤を含有することもできる。これはさらに多様な方法でタンパク質分子同士を連結することができる酵素を含有する。それにより達成された架橋により、活性成分が埋め込まれるタンパク質ひいてはマトリックスに水溶性の減少及び安定性の増大が付与される。

【0025】得られた活性成分調製剤は架橋したマトリックスの分布に関してほぼ均一である。

【0026】有利な架橋可能なタンパク質は、ゼラチン、例えば骨ゼラチン、ウシゼラチン、魚ゼラチン、牛乳タンパク質、例えばカゼイン、ダイズタンパク質、トウモロコシタンパク質及びコラーゲン、特に有利なタンパク質は牛乳タンパク質及びダイズタンパク質である。本発明による架橋性酵素は、トランスグルタミナーゼ、特に微生物から得られたトランスグルタミナーゼ、特に微生物由来のトランスグルタミナーゼである。

【0027】有利な活性成分はビタミン、ヒトの食品添加物及び動物飼料添加物である。疎水性活性成分が特に有利であり、容易に酸化しやすいようなものが特に有利である。A、D、E及びKのグループのビタミンがこのような物質である。有利なヒトの食品添加物及び動物飼料添加物はカロテン及びカロテノイド、例えばβ-カロテン及び、例えばアスタキサンチン、アスタシン、エチル アポーS'-カロテノエート、シトラナキサンチン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、アポーS'-カロテナール、ルテイン、カプサンチン、リコペン及びこれらの混合物である。

【0028】このエマルションは疎水性離型剤、例えば疎水性シリカ、天然スターチ、例えばコーンスターチ、疎水性スターチ誘導体、例えば疎水性コーンスターチ、長鎖脂肪酸の塩又はこれらの物質の混合物を用いてアトマイゼーションされる。しかしながら、この離型剤は最初にスプレー室中で、例えば不活性ガス（例えば窒素）中の疎水性シリカ粒子として存在していてもよい。引き続きアトマイゼーションされた粒子の乾燥は場合により離型剤の除去の後に、場合により80℃まで、有利に60℃まで軽度に加熱しながら、特に有利に室温で、空気流又は保護ガス流中で処理することにより行われる。

【0029】

【実施例】例1

ゼラチン (type A 100 Bloom) 81.8 g及びイソスイート (Isosweet; Amylin 社製) 50.7 gを水360 g中で分散させ、60℃で30分間攪拌することにより溶解を導いた。次にコンスターチ62.6 gを添加し、全ての成分が均一に分散するまで攪拌を続けた。引き続き、エトキシクイン (Ethoxyquin) (100 mg / 10<sup>6</sup> I.U.) 及びBHT (4.5 mg / 10<sup>6</sup> I.U.) を添加することにより安定化されたビタミンA アセテート62.9 gを添加した。ビタミンAを高い効率のある攪拌機を使用することにより水相中へ乳化させた。最終的に、結果として得られたエマルションを濃度10%の水酸化ナトリウム水溶液を添加することによりpH 8.0に調整し、バクテリアのトランスグルタミナーゼ200ユニットの水溶液20 mlと混合した。

【0030】得られたエマルションを55℃で一成分ノズルを通し、圧力4.2 bar下で疎水性シリカで負荷された窒素雰囲気中へアトマイゼーションした。得られた生成物を次に室温で残留水分含有率4.2%になるま

で15時間以内で窒素流内で流動層乾燥器中で乾燥させた。

【0031】例2

上記の例のように乾燥粉体を製造したが、トランスグルタミナーゼを添加しなかった。この生成物は、乾燥後に残留水分含有率3.9%を有した。

【0032】例3

例2からの乾燥粉体の一部分を油浴中、回転フラスコ内で120℃で20分間熱処理にかけ、その際、メイラード反応により褐色の変色が生じた。生成物の残留水分含有率は、この方法で1.9%に減少した。

【0033】例4

アスタキサンチン調製剤を欧州特許出願公開第0065193号明細書中に詳述されている方法により製造した。

【0034】アスタキサンチン30 gをイソプロパノール240 g中にアスコルビルパルミテート1.1 g及びエトキシクイン6.4 gと一緒に懸濁させ、圧力調節バルブを30 barに設定して混合室中でイソプロパノール370 gと連続的に混合した。懸濁サイドの供給速度6 l/h及び溶媒サイドの供給速度9 l/hで、混合室中で173℃の混合温度に設定した。滞留時間0.3秒後に、分子分散液をもう1つの混合室中で水4000 g中のゼラチン38.6 g及びブドウ糖105 gのpH9.5に調整した溶液と処理速度80 l/hで混合した。コロイド分散した活性成分懸濁液が得られた。粒度分析は分布幅±31%の平均0.15 μmを示した。

【0035】コロイド分散懸濁液を固体含有率約25%まで薄層エバポレーター中で濃縮した。濃縮した生成物を次に60℃で融解し、バクテリアのトランスグルタミナーゼ250ユニットの水溶液50 mlを添加し、櫛型攪拌機を用いて四つ口フラスコ中で攪拌した。

【0036】仕上がった分散液をオートクレープに投入し、ノズルを通してスプレー剤としてSipernat D17を空气中に分散して含有する容器中へアトマイズした。このように製造された乾燥粉体を水分含有率<6%まで流動層乾燥機中で室温にて20時間以内で乾燥させた。

【0037】例5

粒度250~355 μmのフラクションを得られた乾燥粉体からスクリーニングし、標準プレミックス中で安定度試験にかけた。このために、試験試料約100 mgを試験管（各々の試料及び試験時間に対して4秤量）に計量し、ふすま60%、シリカ上で濃度30~50%のコリンクロリド及び、37.43% CuSO<sub>4</sub>×5 H<sub>2</sub>O; 46.78% FeSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O; 11.79% ZnO; 3.61% MnO及び0.39% CoCO<sub>3</sub>からなる微量元素混合物10%からなるプレミックス4 gを添加し、引き続き注意をしながら手で混合した。

【0038】試験試料をキャビネット内の開放容器中

で、一定の温度及び湿度（40℃及び70%rel.湿度）で6週間貯蔵した。貯蔵開始及び4週間後及び6週間後に、それぞれの試験時点で準備された4つの試験試料を取り出し、ビタミンA活性成分の残存含有量を試験した。

【0039】試験結果は、以下の表に示す：

ビタミンA残留率（%）

試験生成物

【0040】

【表1】

乾燥粉末	開始 (I.E./g)	4週間後	6週間後
1. トランスグルクミナーゼを添加	494984	86.7	79.5
2. トランスグルタミナーゼを添加せず	520924	85.1	76.6
3. 2と同様、熱的処理	526144	87.4	80.7

【0041】例6

例1のようにエマルションを水420g、ゼラチン100B106m A 102.3g、イソスイート63.4g、ビタミンAアセテート（2160000IU./g；エトキシイン100mg/百万 I. U. 及びBH T14.5mg/百万 I. U. で安定化させた）76.5g及びコーンスターチ80.6gを用いて製造し、次に濃度10%の水酸化ナトリウム水溶液でpH 8.0に調整した。このエマルションを3等分し、次のように処理した：

A：添加物なし

B：多糖中のトランスグルタミナーゼ（“TG”）の濃度1%調製剤2.05gの添加

C：多糖中のトランスグルタミナーゼ（“TG”）の濃

度1%調製剤5.11gの添加

これらのエマルションを疎水性シリカで負荷された窒素雰囲気中へ例1のようにアトマイゼーションした。

【0042】バッチAを窒素流中、室温で残留水分含有率が3.1%になるまで乾燥させた。その一部を付加的に120℃で20分間加熱した。

【0043】バッチBを室温で乾燥し及び15時間貯蔵後に室温で同様に流動層中で乾燥させた。

【0044】バッチCをバッチBのように処理した。

【0045】得られた生成物を例5のように安定度試験にかけた。測定データは、以下の表にまとめた：

【0046】

【表2】

生成物	処理	ビタミンA 含有量 (I.E./g)	残留水分 含有率 (%)	4週間後の 残留率 (%)	6週間後の 残留率 (%)
添加物なし	流動層乾燥器	548700	3.1	53.9	29.1
添加物なし	流動層乾燥器 + 熱的架橋	563300	1.5	63.8	45.9
2.05 g TG	流動層乾燥器	543600	3.9	56.2	34.5
2.05 g TG	室温で15時間 + 流動層乾燥器	541900	3.4	54.8	32.4
5.11 g TG	流動層乾燥器	540000	3.2	62.6	35.5
5.11 g TG	室温で15時間 + 流動層乾燥器	544600	3.6	64.4	39.7

【0047】

【表3】

生成物	処理	拡散速度 ( $\mu$ sec, $\tau$ )	強度 (kcps)
添加物なし	流動層乾燥	596.3	559.3
		581.2	579.0
		552.2	543.3
添加物なし	流動層乾燥 + 熱的架橋		
2.05 g TG	流動層乾燥	510.7	545.4
		514.6	536.4
		496.9	536.4
2.05 TG	室温で15時間 流動層乾燥		
5.11 g TG	流動層乾燥	544.0	518.3
		574.4	539.1
		549.5	542.3
5.11 g TG	室温で15時間 流動層乾燥		

【0048】ゼラチンは、多様な大きさのタンパク質分子の混合物である。全ての分子は、蛍光染料によって標識された。観察時間の間、著しい架橋の場合には、最小の分子のみが架橋ゼラチンの網状構造を抜けることができた。さらに、比較的小さい分子は架橋により直接に影響を受ける確率が低かった。トランスグルタミナーゼにより著しく架橋しているゼラチンの上澄液中の分子サイズのFCSによる観察では、高い拡散速度( $\tau$  ( $\mu$ 秒))は対照よりも小さい) - 小さい分子サイズの典型を

示した。強度( $I$ , kcps)が全ての試料間で十分に比較可能であることも観察できた。

#### 【0049】例7

他の試験では、アスタキサンチン分散液に例4のように多様な量のトランスグルタミナーゼを添加して乾燥粉体に加工した。

#### 【0050】

#### 【表4】

添加物	処理	作用物質含有率 $\tau$ (%)	6週間後の残留率 (%)
なし	RTで乾燥	11.4	67
0.01 % TG	RTで乾燥	11.5	80
0.05 % TG	RTで乾燥	11.2	75

RT = 室温  $\sim$  23°C

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	(参考)
A23K 1/16	303	A23K 1/16	303F
	304		304B
1/165		1/165	C
A23L 3/3463		A23L 3/3463	
(72)発明者 ローラント ベッツ		(72)発明者 トーマス フリードリッヒ	
ドイツ連邦共和国 ニーダーキルヒェン		ドイツ連邦共和国 ダルムシュタット	ザ
イム ブリュール 5		ールバウシュトラッセ 22-24	
(72)発明者 エーリック リューデッケ			
ドイツ連邦共和国 ムターシュタット			
ーマスーマンシュトラッセ 27			

(7) 開2001-78718 (P2001-78718A)

Fターム(参考) 2B150 CC11 CC14 CE06 CE08 DC23  
DD11 DE02 DE14 DE15 DF11  
4B018 LE03 MD23 MD24 MD26 MF02  
MF06 MF07 MF12  
4B021 LA02 MC03 MC07 MP05